

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problems Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(19)



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets



(11) Veröffentlichungsnummer: **0 537 492 A2**

(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(21) Anmeldenummer: 92115888.7

(51) Int. Cl. 5: **C07D 475/04**

(22) Anmeldetag: 17.09.92

(30) Priorität: 15.10.91 CH 3019/91

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:
21.04.93 Patentblatt 93/16

(84) Benannte Vertragsstaaten:
**AT BE CH DE DK ES FR GB GR IE IT LI LU MC
NL PT SE**

(71) Anmelder: **EPROVA Aktiengesellschaft**
Im Laternenacker 5
CH-8200 Schaffhausen(CH)

(72) Erfinder: **Müller, Hans Rudolf**
Beckenwäldli 18
CH-8207 Schaffhausen(CH)
Erfinder: **Ulmann, Martin**
Steigstrasse 36
CH-8447 Dachsen(CH)
Erfinder: **Conti, Josef**
Winkelriedstrasse 22
CH-8203 Schaffhausen(CH)

(54) **Stabile Salze von 5,10-Methylenetrahydrofolsäure.**

(57) Die Erfindung betrifft neue, in fester Form stabile Salze der 5,10-Methylen-(6R)-, (6R,S)- und (6S)-tetrahydrofolsäure mit Schwefelsäure oder einer Sulfonsäure, Verfahren zur Herstellung dieser Salze sowie deren Verwendung als Bestandteil und/oder als Ausgangsmaterial zur Herstellung von Arzneimitteln.

EP 0 537 492 A2

Die Erfindung betrifft neue stabile Salze von 5,10-Methylen-N-[4-[(2-amino-1,4,5,6,7,8-hexahydro-4-oxo)-(6R)-, (6R,S)- oder (6S)-pteridinyl)-methyl]amino]benzol]-L-glutaminsäure - im folgenden kurz 5,10-Methylen-(6R)-, (6R,S)- oder (6S)-tetrahydrofolsäure genannt - mit Schwefelsäure oder einer Sulfonsäure sowie deren Herstellung und Verwendung.

Tetrahydrofolate sind die biologisch aktiven Formen der Folsäure (Folsäure-Co-Faktoren).

Als Arzneimittel werden Tetrahydrofolate vorwiegend als Calciumsalz der 5-Formyl-5,6,7,8-tetrahydrofolsäure [Leucovorin] verwendet, z.B. zur Verstärkung des therapeutischen Effektes von 5-Fluoruracil oder z.B. als Rescue-Substanz beim Einsatz von Methotrexat in der Krebstherapie.

Im Organismus wird 5-Formyl-(6S)-tetrahydrofolsäure in 5,10-Methylen-(6R)-tetrahydrofolsäure umgewandelt, welche als Co-Faktor mit aus 5-Fluoruracil (5-FU) gebildetem 5-Fluor-Desoxyuridinmonophosphat (5-F-dUMP) und Thymidylat-Synthetase (TS) einen cytostatisch wirksamen covalenten ternären Komplex:

5-F-dUMP/TS/Methylentetrahydrofolsäure bildet. Siehe dazu: W.A. Bleyer, Cancer, March 15 Supplement 1989: S. 995-1007 sowie E.L.R. Stokstad, Folic Acid Metabolism in Health and Disease 1990 (Wiley-Liss Inc), Seite 9.

Es wäre daher von Vorteil, anstelle von Leucovorin (5-Formyltetrahydrofolsäure) direkt den Co-Faktor 5,10-Methylentetrahydrofolsäure zu verwenden. Bisher scheiterte dieses Unterfangen an der nicht ausreichenden Reinheit und Stabilität von 5,10-Methylentetrahydrofolsäure und deren Salze. Vergleiche dazu EP-A-0 409 125.

Es wurde nun überraschend gefunden, dass sich Salze von 5,10-Methylen-(6R)-, (6R,S)- und (6S)-tetrahydrofolsäure nach Umsetzung der entsprechenden diastereomeren Form der 5,10-Methylentetrahydrofolsäure insbesondere mit Schwefelsäure oder aber auch mit Sulfonsäuren in bisher nie erreichter Reinheit und ausgezeichneter Stabilität erhalten lassen.

Die diastereomeren Formen der 5,10-Methylentetrahydrofolsäure werden bevorzugt aus dem durch die schweizerische Patentanmeldung Nr. 108 vom 16.01.1991 leicht zugänglich gewordenen (6S)-, (6R,S)- und (6R)-Tetrahydrofolsäure-Sulfat oder Sulfonsäure-Salz **in situ** durch Umsetzung mit Formaldehyd hergestellt. Dabei entsteht aus der natürlichen (6S)-Tetrahydrofolsäure die natürliche 5,10-Methylen-(6R)-tetrahydrofolsäure. Das rührt daher, dass die absolute Konfiguration am C-6 der natürlichen Tetrahydrofolsäure nach J.C. Fontecilla-Camps et al. J. Amer. chem. Soc. 101 - (20), 6114-15 (1979) gemäss der Sequenz-Regel mit S zu spezifizieren ist und diejenige an C-6 der natürlichen 5,10-Methylentetrahydrofolsäure mit R.

Siehe R. Kalbermatten et al., Helv. chim. Acta 64(8), 2627 (1981), Fussnote 4.

Die Umsetzung mit Schwefelsäure bzw. einer Sulfonsäure wird in Wasser und/oder in Gegenwart einer niedrigen aliphatischen wasserlöslichen Carbonsäure oder eines niedrigen Alkohols vorgenommen, wobei der Zusatz eines Alkohols auch zur Ausscheidung des gebildeten Sulfates oder Sulfonates dient.

Die erhaltenen Produkte sind in fester Form bei Raumtemperatur praktisch unbeschränkt stabil. Sie sind geeignet als Bestandteile von oralen Arzneimittelformen oder als Ausgangsmaterial zur Herstellung von parenteralen Arzneimittelformen. Sowohl die oralen als auch die parenteralen Arzneimittelformen sind z.B. zur Krebstherapie, zur Behandlung von bestimmten Anämie-Formen, von Autoimmunkrankheiten und von neuralen Störungen geeignet.

Gegenstand der Erfindung sind demnach die Salze von (6R)-, (6R,S)- und (6S)-5,10-Methylentetrahydrofolsäure mit Schwefelsäure oder einer Sulfonsäure.

Bevorzugte Verbindungen sind:

5,10-Methylen-(6R)-tetrahydrofolsäure * Sulfat,
5,10-Methylen-(6R,S)-tetrahydrofolsäure * Sulfat,
5,10-Methylen-(6S)-tetrahydrofolsäure * Sulfat,
5,10-Methylen-(6R)-, (6R,S)-, (6S)-
tetrahydrofolsäure * Benzolsulfonat,
5,10-Methylen-(6R)-, (6R,S)-, (6S)-
tetrahydrofolsäure * Toluol-4-sulfonat sowie
5,10-Methylen-(6R)-, (6R,S)-, (6S)-
tetrahydrofolsäure * Methansulfonat.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist das Verfahren zur Herstellung der Salze von 5,10-Methylen-(6R)-, (6R,S)- und (6S)-tetrahydrofolsäure mit Schwefelsäure oder einer Sulfonsäure, welches dadurch gekennzeichnet ist, dass man die entsprechende diastereomere Form der 5,10-Methylentetrahydrofolsäure mit Schwefelsäure oder einer Sulfonsäure umsetzt.

Diese Umsetzung wird vorzugsweise mit *in situ* hergestellter 5,10-Methylentetrahydrofolsäure vorgenommen. Die Umsetzung erfolgt in einem Lösungsmittel bestehend aus Wasser oder einem mit Wasser mischbaren organischen Lösungsmittel wie einer niedrigen aliphatischen Carbonsäure oder einem niedrigen Alkohol.

Als Salzbildner kommen bevorzugt neben der Schwefelsäure in Betracht Benzolsulfonsäure, eine Toluolsulfonsäure, Xylolsulfonsäure, Nitrobenzolsulfonsäure, Chlorbenzolsulfonsäure, Nitrotoluolsulfonsäure, Naphthalinsulfonsäure, substituierte Naphtalinsulfonsäure, eine Camphersulfonsäure, Phenylmethansulfonsäure, Methansulfonsäure, Ethansulfonsäure, eine Propansulfonsäure oder Butansulfonsäure.

Als Lösungsmittel für die Isolierung der Salze von 5,10-Methylen-tetrahydrofolsäure wird Wasser, eine niedrige aliphatische wasserlösliche Carbon-säure wie Essigsäure, Milchsäure, Ameisensäure, ein wasserlöslicher Alkohol wie Methanol, Ethanol, Isopropanol oder ein Gemisch derselben einge-setzt.

Die Erfindung betrifft auch die Verwendung der stabilen Salze von 5,10-Methylen-(6R)-, (6R,S)-oder (6S)-tetrahydrofolsäure mit Schwefelsäure oder einer Sulfonsäure als Bestandteil und/oder Ausgangsmaterial zur Herstellung von Arzneimit-teln.

Beispiele zur Illustrierung der Erfindung

Beispiel 1

5,10-Methylen-(6R)-THF•Sulfat

A. Herstellung von 5,10-Methylen-(6R)-tetrahydrofolsäure

100 g z.B. nach der in der schweizerischen Patentanmeldung Nr. 108 vom 16.01.1991 be-schriebenen Methode hergestelltes reines (6S)-Te-tetrahydrofolsäure•Benzolsulfonat werden in Wasser suspendiert. Durch Zusatz von 1 N Natronlauge wird das pH auf 7,5 gebracht. Nun fügt man 15 ml 37%ige wässrige Formaldehyd-Lösung zu und stellt mit 2 N Schwefelsäure auf pH 2,5. Die gebil-dete 5,10-Methylen-(6R)-tetrahydrofolsäure fällt aus und wird abfiltriert. Menge: 74g.

B. Herstellung von 5,10-Methylen-(6R)-tetrahydrofolsäure•Sulfat

74 g 5,10-Methylen-(6R)-tetrahydrofolsäure werden in 370 ml Eisessig gelöst und in eine Lösung von 97 ml 4 N wässriger Schwefelsäure in 200 ml Eisessig eingetropft. Nach einiger Zeit kri-stallisiert 5,10-Methylen-(6R)-tet-rahydrofolsäure•Sulfat der Formel Methylen-(6R)-THF•H₂SO₄ aus. Nach Zusatz von 500 ml Ethanol wird das Produkt abfiltriert. Das Produkt lässt sich aus Ameisensäure mit Ethanol oder aus Essigsäure mit Ethanol/H₂SO₄ umfällen.

Ausbeute: 71 g; Gehalt 98% (bestimmt mittels HPLC).

$[\alpha]_D^{25} = +120^\circ$ (c = 1% in DMF)

Löslichkeiten: Methylen-(6R)-THF•H₂SO₄ ist ziem-lich wenig löslich in Wasser, löslich in siedender 50% Essigsäure und leicht löslich in heissem Ei-sessig.

Beispiel 2

5,10-Methylen-(6R)-THF•Sulfat

20g nach der schweizerischen Patentanmel-dung Nr. 108 vom 16.01.1991 hergestelltes (6S)-Tetrahydrofolsäure•Sulfat werden in Wasser su-spendiert. Durch Zusatz von 2 N Natronlauge wird das pH auf 8,6 eingestellt. Nun setzt man 3,6 ml 37%ige wässrige Formaldehyd-Lösung zu. Nach 15 Minuten wird die erhaltene Lösung in eine Lö-sung von 100 ml 2 N Schwefelsäure in 100 ml Eisessig eingerührt. Das ausgeschiedene Produkt wird abfiltriert und mit Ethanol gewaschen. Man erhält auf diese Weise 14 g Titelverbindung. Gehalt, bestimmt mittels HPLC: 98,7% Methylen-(6R)-THF•H₂SO₄.

Beispiel 3

5,10-Methylen-(6S)-THF•Sulfat

5 g (6R)-Tetrahydrofolsäure werden in 36 ml 1 N Natronlauge gelöst und bei pH 8 mit 1,5 ml 36%igem Formaldehyd versetzt. Nach 10 Minuten rührt man die erhaltene Reaktionslösung in 20 ml 2 N Schwefelsäure in 25 ml Eisessig. Nach Zusatz von 30 ml Ethanol wird das ausgeschiedene Pro-dukt abfiltriert. Man erhält 3,8 g Titelverbindung. Gehalt: 96% Methylen-(6S)-THF•Sulfat.

Beispiel 4

5,10-Methylen-(6R)-THF•Sulfat

100 g (6S)-Tetrahydrofolsäure werden in war-mem Eisessig gelöst. Die Lösung wird mit 20 ml 37%igem Formaldehyd versetzt, klarfiltriert und mit 180 ml 4 N wässriger Schwefelsäure versetzt. Nach Zusatz von 1,5 l Ethanol wird das ausgeschiedene Produkt abfiltriert. Es besteht aus der Titelverbin-dung. Gehalt: 97% Methylen-(6R)-THF•H₂SO₄.

Beispiel 5

5,10-Methylen-(6R)-THF•Sulfat

50 g (6S)-Tetrahydrofolsäure•Sulfat, hergestellt z.B. nach der schweizerischen Patentanmeldung Nr. 108 vom 16.01.91, mit einem Gehalt von 99,8% (6S)-THF•H₂SO₄ suspendiert in Wasser, werden durch Zusatz von 200 ml 2 N Natronlauge gelöst und mit 7,5 ml 37%igem Formaldehyd versetzt. Die Reaktionslösung wird in eine Mischung aus 275 ml 2 N Schwefelsäure und 275 ml Eisessig eingetropft. Methylen-(6R)-THF•H₂SO₄ kristallisiert

aus, wird abfiltriert und mit Ethanol gewaschen.
 Ausbeute: 45 g farblores Produkt.
 HPLC-Analyse: 99,6% Methylen-(6R)-THF•H₂SO₄.

Beispiel 6

5,10-Methylen-(6R)-THF•Benzolsulfonat

27,1 g (6S)-Tetrahydrofolsäure•Benzolsulfonat analog vorher werden in Wasser durch Zusatz von 25,8 ml 5 N Natronlauge in Lösung gebracht. Nun fügt man 3,5 ml 37%-ige wässrigen Formaldehyd zu und rührt während 10 Minuten.
 Die erhaltene Reaktionslösung wird in eine Lösung von 21,07 g Benzolsulfonsäure in 100 ml Wasser eingetropft. Das ausgeschiedene Produkt wird abfiltriert, wiederholt in kaltem Ethanol aufgeschlämmt und getrocknet.

Man erhält 21 g Titelverbindung.

HPLC-Analyse: 99,5% Methylen-(6R)-THF•Benzolsulfonat.

$[\alpha]_D^{25} = +102^\circ$ (c = 1% in DMF)

Beispiel 7

5,10-Methylen-(6R)-THF•Toluol-4-sulfonat

27,75 g reines (6S)-Tetrahydrofolsäure•Toluol-4-sulfonat werden in Wasser durch Zusatz von Natronlauge in Lösung gebracht, mit 3,5 ml 37%igem Formaldehyd versetzt und die erhaltene Reaktionslösung wird in eine konzentrierte wässrige Lösung von Toluol-4-sulfonsäure eingerührt.
 Man erhält 23 g Titelverbindung mit einem Gehalt (HPLC) von 98,6%.

Patentansprüche

1. Salze von 5,10-Methylen-(6R)-, (6R,S)- oder (6S)-tetrahydrofolsäure mit Schwefelsäure oder einer Sulfonsäure.
2. 5,10-Methylen-(6R)-, (6R,S)- und (6S)-tetrahydrofolsäure•Sulfat.
3. 5,10-Methylen-(6R)-, (6R,S)- und (6S)-tetrahydrofolsäure•Benzolsulfonat.
4. 5,10-Methylen-(6R)-, (6R,S)- und (6S)-tetrahydrofolsäure•Toluolsulfonat.
5. Methansulfonsäure-, Ethansulfonsäure-, Phenylmethansulfonsäure-, Campher-10-sulfonsäure-, Naphthalin-1-sulfonsäure-, Naphthalin-2-sulfonsäure-, Naphthalin-1,5-disulfonsäure-Additionssalze der 5,10-Methylen-(6R)-, (6R,S)- und (6S)-tetrahydrofolsäure.

6. Verfahren zur Herstellung der in den Ansprüchen 1 bis 5 definierten Salze von 5,10-Methylen-(6R)-, (6R,S)- oder (6S)-tetrahydrofolsäure, dadurch gekennzeichnet, dass die entsprechende diastereomere Form der 5,10-Methylentetrahydrofolsäure mit Schwefelsäure oder einer Sulfonsäure umgesetzt wird.

7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass eine in situ hergestellte 5,10-Methylentetrahydrofolsäure eingesetzt wird.

8. Verfahren nach Anspruch 6 oder 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Umsetzung und Isolierung in Wasser oder einem Gemisch aus Wasser und einem mit Wasser mischbaren organischen Lösungsmittel durchgeführt werden.

9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass als mit Wasser mischbares organisches Lösungsmittel Essigsäure oder ein niedriger organischer Alkohol eingesetzt wird.

10. Verwendung von Salzen der 5,10-Methylen-(6R)-, (6R,S)- oder (6S)-tetrahydrofolsäure mit Schwefelsäure oder einer Sulfonsäure als Bestandteil und/oder als Ausgangsmaterial zur Herstellung von Arzneimitteln.

(19)



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets



(11) Veröffentlichungsnummer: **0 537 492 A3**

(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(21) Anmeldenummer: 92115888.7

(51) Int. Cl. 5: **C07D 487/14, //(C07D487/14,
241:00,239:00,235:00)**

(22) Anmeldetag: 17.09.92

(30) Priorität: 15.10.91 CH 3019/91

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:
21.04.93 Patentblatt 93/16

(54) Benannte Vertragsstaaten:
**AT BE CH DE DK ES FR GB GR IE IT LI LU MC
NL PT SE**

(88) Veröffentlichungstag des später veröffentlichten
Recherchenberichts: 23.06.93 Patentblatt 93/25

(71) Anmelder: **EPROVA Aktiengesellschaft
Im Laternenacker 5
CH-8200 Schaffhausen(CH)**

(72) Erfinder: **Müller, Hans Rudolf
Beckenwäldli 18
CH-8207 Schaffhausen(CH)
Erfinder: Ulmann, Martin
Steigstrasse 36
CH-8447 Dachsen(CH)
Erfinder: Conti, Josef
Winkelriedstrasse 22
CH-8203 Schaffhausen(CH)**

(54) **Stabile Salze von 5,10-Methylentetrahydrofolsäure.**

(57) Die Erfindung betrifft neue, in fester Form stabile Salze der 5,10-Methylen-(6R)-, (6R,S)- und (6S)-tetrahydrofolsäure mit Schwefelsäure oder einer Sulfonsäure, Verfahren zur Herstellung dieser Salze sowie deren Verwendung als Bestandteil und/oder als Ausgangsmaterial zur Herstellung von Arzneimitteln.

EP 0 537 492 A3



Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung

EP 92 11 5888

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. Cl.5)
X	EP-A-0 348 641 (EPROVA) *Insgesamt*	1-10	C07D487/14 //(C07D487/14, 241:00,239:00, 235:00)
A	US-A-3 468 886 (CAROL W. MOSKER ET. AL.) *Insgesamt*	1	
D,P, A	EP-A-0 495 204 (EPROVA) *Insgesamt*	1	
			RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int. Cl.5)
			C07D
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Recherchesort DEN HAAG		Abschlußdatum der Recherche 23 APRIL 1993	Prüfer LUYTEN H.W.
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentedokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus andern Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument			

EPO FORM 1503 (01.92) (P0400)